

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ  
ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING  
INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

## FUNKCIONALIZOVANÉ NANOSTRUKTURY FUNCTIONALIZED NANOSTRUCTURES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

ROSTISLAV MĚCH

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. MIROSLAV KOLÍBAL, Ph.D.

BRNO 2012



sem vložit zadání



## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá funkcionalizovanými nanostrukturami. V první části jsou zmíněny materiály vhodné pro funkcionalizaci, využití funkcionalizovaných nanostruktur v oblasti medicíny a biochemie a metody detekce změn optických vlastností. Ve druhé části jsou zkoumány změny optických vlastností nanostruktur po funkcionalizaci pomocí spektroskopické elipsometrie a FTIR spektroskopie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

funkcionalizované nanostruktury, funkcionalizace, biosenzory, zlaté nanočástice, jednovláknová DNA, křemík, elipsometrie, FTIR.

## **ABSTRACT**

This thesis deals with functionalized nanoparticles. In the first part there are mentioned materials suitable for a functionalization, the usage of functionalized nanoparticles in medicine and biochemistry and detection methods of changes of optical properties. In the second part changes of optical properties after functionalization are investigated by spectroscopic ellipsometry and FTIR spectroscopy.

## **KEYWORDS**

functionalized nanostructures, functionalization, biosensors, gold nanoparticles, single stranded DNA, silicon, elipsometry, FTIR.

MĚCH, R. *Funkcionalizované nanostruktury*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 45 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.



## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma „Funkcionalizované nanostruktury“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této bakalářské práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne .....

.....  
(podpis autora)





## Poděkování

Rád bych poděkoval všem kteří se, přímo či nepřímo, podíleli na vzniku této práce. V prvé děkuji vedoucímu bakalářské práce Ing. Miroslavu Kolíbalovi, Ph.D. za cenné rady a vstřícnost při řešení problémů. Také děkuji Ing. Lukáši Břínkovi a Ing. Ondřeji Tomancovi za spolupráci při vyhodnocování experimentů, RNDr. Aliosu Nebojsovi a Dipl.-Ing. Zlatě Vrátníčkové za vstřícnost a pomoc při měření experimentů a Jiřímu Babockému za pomoc při přípravě vzorků. V neposlední řadě děkuji svým rodičům a přítelkyni za jejich podporu během studia i mimo něj.

Rostislav Měch



# OBSAH

<b>1 Úvod</b>	<b>13</b>
<b>2 Materiály vhodné k funkcionalizaci</b>	<b>15</b>
2.1 Ušlechtilé kovy . . . . .	15
2.2 Magnetické materiály . . . . .	16
2.3 Ostatní materiály . . . . .	17
<b>3 Funkcionalizace</b>	<b>18</b>
3.1 Funkcionalizace za účelem detekce . . . . .	18
3.1.1 Detekce těžkých kovů . . . . .	18
3.1.2 Detekce toxinů . . . . .	20
3.1.3 Detekce bakteriálních antigenů . . . . .	21
3.1.4 Detekce markerů chorob . . . . .	23
3.1.5 Detekce aptamerů, oligonukleotidů a DNA . . . . .	25
3.2 Funkcionalizace za účelem stabilizace koloidních roztoků . . . . .	27
3.3 Funkcionalizace za účelem cíleného navádění nanočástic . . . . .	29
3.4 Funkcionalizace za účelem studia molekulových interakcí . . . . .	29
<b>4 Metody detekce</b>	<b>31</b>
4.1 Kolorimetrie . . . . .	31
4.2 Elipsometrie . . . . .	31
4.3 SPR . . . . .	32
4.4 LSPR . . . . .	33
4.5 FTIR . . . . .	34
<b>5 Praktická část</b>	<b>35</b>
5.1 Příprava nanostruktur pro funkcionalizaci . . . . .	35
5.2 Roztoky pro funkcionalizaci . . . . .	36
5.3 Elipsometrické měření . . . . .	36
5.4 FTIR . . . . .	39
<b>6 Závěr</b>	<b>41</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	<b>43</b>



# 1 ÚVOD

Funkcionalizované nanostruktury patří mezi nejvýznamnější témata, kterými se zabývají vědečtí pracovníci v mnoha oborech. Funkcionalizace propůjčuje nanostrukturám unikátní vlastnosti, kterými za normálních podmínek nedisponují (například specifickou reaktivitu) nebo může naopak uchovávat vlastnosti, které by nanostruktury časem ztrácely (například oxidací).

Tato práce se zaměřuje na funkcionalizované nanočástice z pohledu možného využití v oblastech biochemie a medicíny. Jsou zde zmíněny materiály vhodné k funkcionalizaci. Dále je rozepsáno využití funkcionalizovaných nanostruktur jako prostředku ke zlepšení dosavadních senzorů využívaných především v medicíně. Jsou zde zmíněny i práce, kde detekční limity koncentrací detekovaných látek takto upravených senzorů mohou být až v řádech jednotek  $\text{fmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Toho se může využít k detekci onemocnění, chorob, ale také životu nebezpečných látek či bakterií jak v prostředí, tak i v potravinách. Funkcionalizované nanočástice se mohou využít také při rozborech a čištění vodních zdrojů od těžkých kovů. V medicíně se mohou funkcionalizované nanostruktury díky jejich cílenému navádění uplatnit v boji proti rakovině nebo nádorovým onemocněním, což může výrazně snížit vedlejší účinky celé terapie. V biomedicíně a biochemii se funkcionalizované nanostruktury mohou využít jako prostředky k sledování síly molekulových interakcí, genovému inženýrství, stabilizaci koloidních roztoků nebo jako dopravních prostředků účinných látek do buněk nebo jejich okolí. Tyto možnosti jsou popsány v první části této práce společně s metodami detekce změn optických vlastností nanostruktur vlivem funkcionalizace.

Ve druhé části jsou rozebrány provedené experimenty. Jsou zde popsány přípravy vzorků nanostruktur pro měření změn optických vlastností vlivem funkcionalizace jednovláknovou DNA (z anglického DeoxyriboNucleic Acid – deoxyribonukleová kyselina). Měření byla provedena na elipsometru a FTIR (z anglického Fourier Transform InfraRed spectroscopy – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) spektrometru. Jsou zde uvedeny a zhodnoceny výsledky obou měření s návrhem dalšího postupu ve zkoumání celé problematiky.



## 2 MATERIÁLY VHODNÉ K FUNKCIONALIZACI

Funkcionalizace je definována jako umístění funkčních skupin chemických sloučenin na povrch nanostruktur.

Funkcionalizace se provádí vícefunkčními molekulami tak, aby jedna funkční skupina sloužila k přichycení na povrch nanostruktur a jedna či více ostatních byly přístupné k navázání dalších chemických látek.

V této kapitole budou popsány materiály vhodné k funkcionalizaci.

### 2.1 Ušlechtilé kovy

Nejčastějším materiálem, který se využívá na výrobu nanostruktur vhodných k funkcionalizaci jsou ušlechtilé kovy. Kovy, kterých se hojně využívá jsou především zlato a stříbro. Jenich funkcionalizace se provádí podobně, proto se v dalším textu budu zabývat funkcionalizací zlata. Zlaté nanostruktury se pro využití v biosenzorech funkcionalizují nejrůznějšími biochemickými sloučeninami, ale základní princip je u všech stejný. Všechny biomolekuly, které je potřeba navázat na zlatý povrch (antény, nanočástice) je potřeba nejdříve opatřit thiolovou skupinou (-SH), která pak s povrchem zlatých nanostruktur dobře interaguje.

Jelikož je zlato inertní materiál, vědce zajímalo, jak se síra na povrch zlatých nanostruktur váže. Byla provedena simulace a podle *ab initio* výpočtů se ukázalo, že se síra na zlato neváže kovalentní vazbou, ale vazba je vytvořena sdílením elektronů jednoho atomu síry se třemi atomy zlata [1].

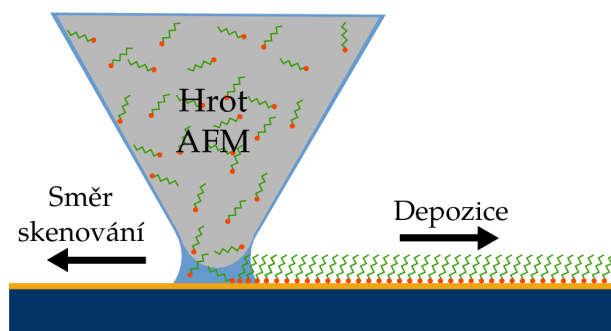
Imobilizace thiolovaných molekul na povrch zlatých nanočástic lze provádět nejrůznějšími způsoby:

**Náhodnou funkcionalizací**, kdy je celý povrch nanostruktur ve styku s kapalinou a molekuly se tak mají možnost přichytit na povrch náhodně.

**Vytvářením SAM** (samouspořádané monovrstvy – z anglického Self Assembled Monolayer), kde se uplatňují protichůdné silové účinky jednotlivých složek molekul a molekuly se uspořádávají ve snaze o dosažení termodynamického stavu s minimem energie. Síly uplatňující se při tvoření SAM jsou například hydrofilní a hydrofobní interakce, kapilární, van der Waalsovy, Coulombické síly nebo vodíkové můstky.

**Funkcionalizací pomocí DPL (Dip Pen Lithography)** – které se provádí pomocí modifikovaného AFM hrotu (viz obrázek 2.1).

**Vytvářením složitějších multivrstev**, kdy se například na již vytvořenou monovrstvu dále chemicky vážou další vrstvy. To se provádí, aby na povrchu multivrstvy byly potřebné funkční skupiny.



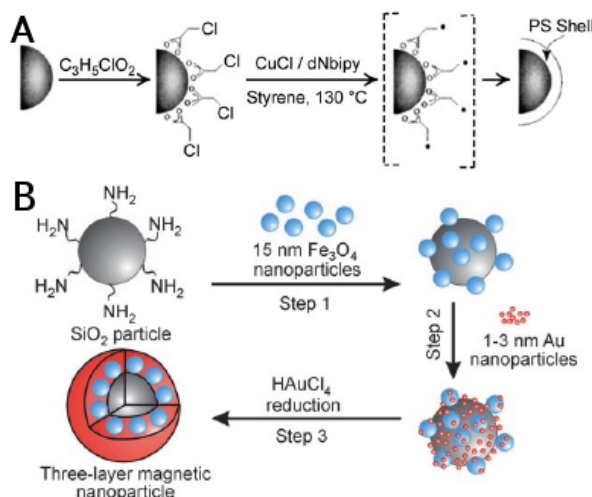
Obrázek 2.1: Dip pen lithography – hrot AFM se ponoří do kapky roztoku s molekulami, kterými chceme povrch funkcionalizovat. Po zahájení skenování se za hrotem vytváří samouspořádaná monovrstva na základě výše uvedených protichůdných silových účinků působících na molekulu. V tomto případě si thiolová skupina (naznačená oranžovou kuličkou) sedá na zlatý povrch a uhlíkaté řetězce (naznačené zelenou lomenou čarou) se samouspořádávají na základě působení hydrofobních sil.

## 2.2 Magnetické materiály

Magnetické materiály se většinou používají ve spojení s nanočásticemi. U těchto struktur je velice důležité, aby si svoji magnetickou vlastnost udržely i po funkcionalizaci na delší čas. Toho se dosahuje obalením magnetických nanočástic do kapsle z jiného materiálu tak, aby se k nim nedostal například kyslík. V případě materiálů, které se mohou pasivovat oxidací, se jejich povrch upraví mírnou oxidací [2].

Magnetické nanočástice se nejčastěji obalují do těchto druhů materiálů: surfaktanty a polymery, ušlechtilé kovy, oxid křemičitý a uhlík (viz obrázek 2.2A). Rovněž se využívá zabudování magnetických nanočástic do jiného materiálu, který je chrání před vnějšími vlivy (viz obrázek 2.2B) [2].





Obrázek 2.2: Příklady postupů přípravy kapslí magnetických nanočástic. (A) Postup vytvoření polystyrenové kapsle. V prvním kroku využita kyselina 3-chlor propionová ( $C_3H_5ClO_2$ ), ve druhém přidán chlorid měďný ( $CuCl$ ) s 4-4-dinonyl-2,2-bipyridin ( $dNbipy$ ) a styren. Zahřáto na  $130\text{ }^{\circ}C$  kvůli polyperizaci. (B) Zabudování magnetických nanočástic do jiného materiálu. V prvním kroku jsou k  $SiO_2$  nanočásticím funkcionalizovaných molekulou zakončenou aminovou skupinou přidány  $15\text{ nm}$  nanočástice  $Fe_3O_4$ . Dále jsou přidány  $1 - 3\text{ nm}$  velké zlaté nanočástice a po redukci kyselinou chlorozlatitou jsou vytvořeny třívrstvé magnetické nanočástice [2].

## 2.3 Ostatní materiály

Dalšími materiály, které se využívají k funkcionalizaci jsou například keramické materiály, křemík nebo diamant. Pro většinu materiálů funkcionalizace umožňuje vytvářet stabilní koloidní roztoky nanočástic. Nebo je možné na funkcionalizovaných površích vytvářet tenké vrstvy, či filmy [3]. Funkcionalizace může také sloužit k ochraně povrchu nanokrystalů, a udržet tak jejich vlastnosti [4] nebo díky mechanickým vlastnostem a chemické stabilitě vytvářet podklady pro různá měření [5].

## 3 FUNKCIONALIZACE

Jak už bylo popsáno, funkcionalizace se provádí vícefunkčními molekulami tak, aby jedna funkční skupina sloužila k přichycení na povrch nanostruktur a jedna či více ostatních byly přístupné k navázání dalších chemických látek.

V následujících kapitolách budou popsány účely funkcionalizace formou demonstrace jednotlivých problémů na vědeckých člancích.

### 3.1 Funkcionalizace za účelem detekce

Funkcionalizované nanostruktury se využívají především k detekci různých chemikálií, biomolekul a dokonce i celých buněk. Staly se neodmyslitelným základem pro výrobu moderních senzorů a zařízení nazývaných „lab-on-chip“ (laboratoř na čipu). V dnešní době je snaha vše miniaturizovat, a proto jsou funkcionalizované nanostruktury pro tvorbu nových senzorů a detektorů nezbytné. Nejen, že funkcionalizované nanostruktury pomáhají v již zmíněné miniaturizaci, ale taky ve většině případů odpadá nutnost látky jakkoli značit (například fluorescenčně).

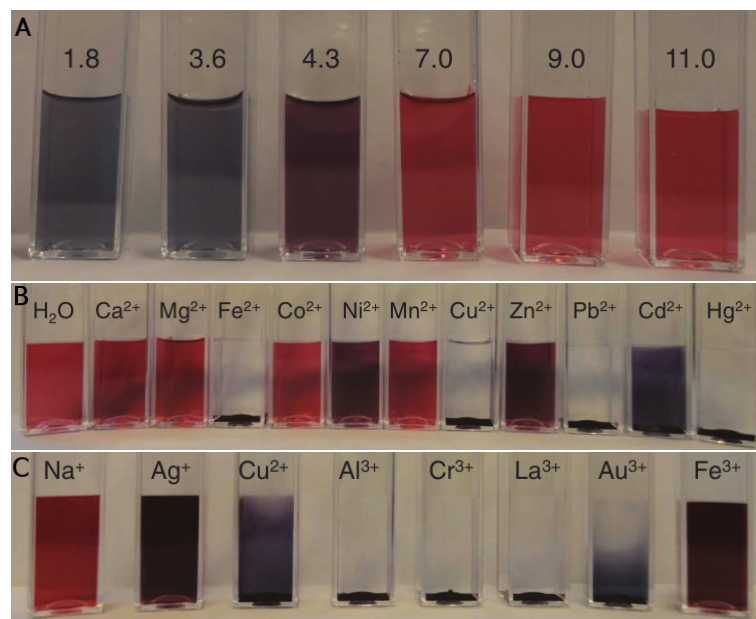
V dalším textu budou popsány vybrané metody detekce těžkých kovů, toxinů, bakteriálních antigenů, markerů chorob, oligonukleotidů a DNA.

#### 3.1.1 Detekce těžkých kovů

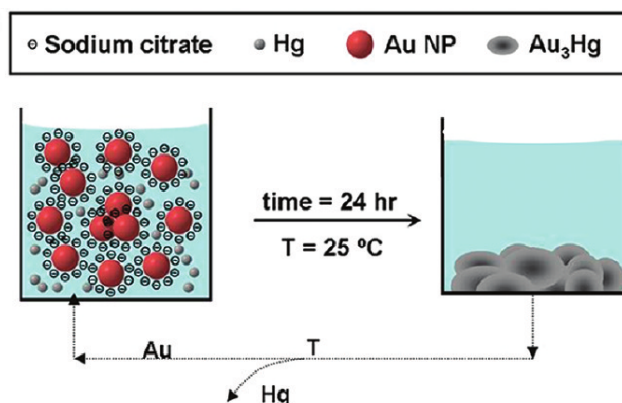
Těžké kovy jsou pro člověka toxické a bývají rizikovým faktorem některých nemocí (např. hliník u Alzheimerovy choroby). To je důvodem hygienických kontrol čistoty studní, přehrad, řek a vodních zdrojů. Funkcionalizované nanočástice jsou vhodným kandidátem na rychlou a snadnou detekci přítomnosti těžkých kovů ve vodě.

Chanana a kol. [6] popsali interakci 15nm zlatých nanočástic funkcionalizovaných insulinem s těžkými kovy a změnu optických vlastností v roztocích o různém pH (obrázek 3.1A). Velice důležité bylo zjištění, že takto připravený roztok dobře reaguje na přítomnost těžkých kovů v roztoku. Jak lze vidět na obrázku 3.1B-C, dobře s takovými částicemi reagují například ionty hliníku, lanthanu, zlata, olova, rtuť, stříbra, chromu, kadmia.

Jiný příklad podal Olea-Jiménez a kol. Ve své práci [7] ukazují, že je možné z vody odstranit těžké kovy pomocí vhodných funkcionalizovaných nanočástic. Demonstrovali to na příkladu vychytávání rtuť z vody (viz obrázek 3.2). Zlaté nanočástice funkcionalizovali citrátem sodným. Ten v tomto případě funguje nejen jako stabilizátor koloidního roztoku zlatých nanočástic, ale zároveň napomáhá celému procesu agregace jako katalyzátor. V odpadní vodě se totiž rtuť vyskytuje ve formě  $Hg^{2+}$ , a aby reagovala se zlatem, je potřeba redukovat tento kationt na  $Hg^0$ . To právě zajišťuje citrát sodný.



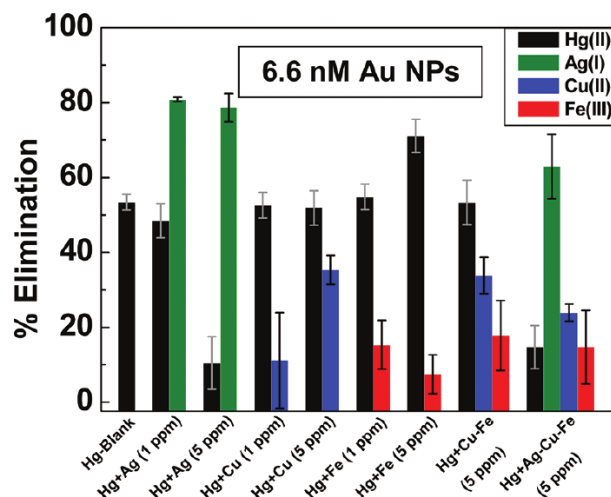
Obrázek 3.1: (A) Insulinem funkcionalizované zlaté nanočástice v přítomnosti roztoků o různém pH. (B-C) Insulinem funkcionalizované zlaté nanočástice v přítomnosti kovů [6]. Na obrázku jde vidět, že v přítomnosti některých iontů zlaté nanočástice agregují díky ovlivnění jejich povrchového náboje, který je stabilizuje (viz sekce 3.2).



Obrázek 3.2: Odstraňování rtuti pomocí citrátem funkcionalizovaných zlatých nanočástic [7]. Na začátku jsou citrátem sodným (Sodium citrate) obalené zlaté nanočástice (Au NP – gold nanoparticles) rozpuštěny ve vodě kontaminované rtutí (Hg). Po 24 hodinách při teplotě 25 °C je vidět, že se na dně z roztoku vyloučil amalgám zlata (Au<sub>3</sub>Hg). Celý systém lze obnovit zahřátím, kdy se z amalgámu vyloučí rtuť a zlato je opět volné k opětovnému použití.

Celý pokus byl opakován i v přítomnosti jiných iontů, aby byly co nejlépe simulovány podmínky v odpadních vodách, kde se uvažuje o využití takto funkcionalizovaných nanočástic. Experimenty vykazovaly až 70% eliminaci rtuti z vody.

Efektivita eliminace nejvíce záležela na koncentraci stříbrných iontů. Při koncentraci stříbra 5 ppm nebylo možno docílit tak vysoké eliminace (nedosáhla ani 20 %) jako při koncentraci 1 ppm (okolo 50 %) (viz obrázek ??). Zřejmě je to způsobeno nasycením povrchu zlatých nanočástic stříbrnými ionty [7].



Obrázek 3.3: Selektivní eliminace Hg v přítomnosti jiných iontů [7]. Na tomto grafu lze vidět ovlivnění eliminace (Elimination) rtuti přítomností různých iontů. V legendě grafu je pak znázorněno o jaké ionty se jednalo, kde číslo v závorce naznačuje oxidační stav kovu (například Hg(II) značí iont  $\text{Hg}^{2+}$ ). Největší pokles eliminace rtuti je v přítomnosti Ag iontů (o koncentraci 5 ppm). Přítomnost  $\text{Fe}^{3+}$  iontů naopak eliminaci Hg zvýšilo.

### 3.1.2 Detekce toxinů

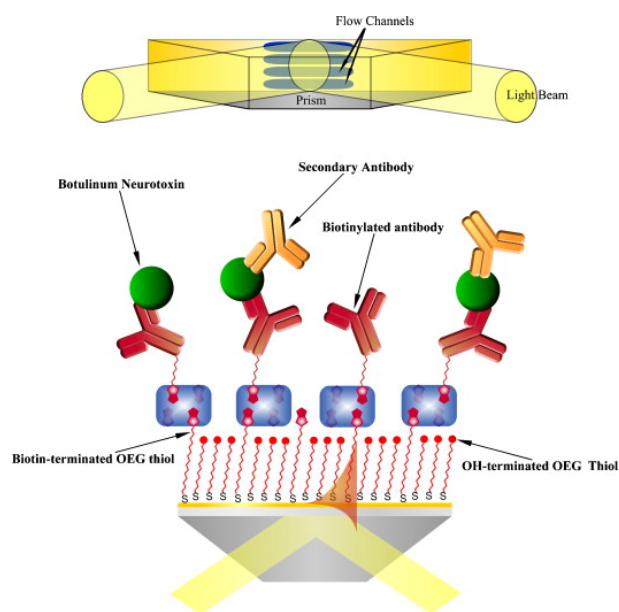
Toxiny jsou bakteriální rostlinné nebo živočišné jedy. Mohou to být malé molekuly, peptidy nebo bílkoviny, které jsou schopny způsobit onemocnění při jejich pohlcení živou tkání, a to interakcí s biologickými makromolekulami, například enzymy nebo buněčnými receptory.

Díky možné hrozbě bio-teroristických útoků byly vyvinuty na základě nanostruktur biosenzory schopné analyzovat možné kontaminované vzorky velice rychle a přesně (30 s - 20 min jeden vzorek). Takto je možné detekovat například ricin nebo antrax.

Výzkumný tým B.N. Feltise [8] studoval možnosti detekce právě zmíněného ricinu, který je pro lidský organismus vysoce toxický (smrtná dávka je  $5 \mu\text{gkg}^{-1}$ ). Funkcionalizací zlatého povrchu protilátkou proti ricinu získali podklad pro SPR senzor (z anglického Surface Plasmon Resonance). Tento senzor využívá změny optických vlastností rezonance povrchových plazmonových polaritonů povrchových plazmonů, viz sekce 4.3). Poté byl na povrch přidán roztok obsahující různé koncentrace ricinu. Pomocí SPR senzoru byli schopni za 10 minut působení ricinu detekovat koncentrace nad  $200 \text{ ngmml}^{-1}$ .

Toxiny se mohou vyskytovat i ve zkažených potravinách působením nejrůznějších bakterií. Například vědecký tým s českou účastí prof. Jiřího Homoly studoval detekci botulotoxinu produkovaného bakteriemi *Clostridium botulinum*, který je rovněž vysoce toxický (smrtelná dávka je  $1 \text{ ng kg}^{-1}$ ) a může se vyskytovat například v nedostatečně tepelně upravených masných a mléčných výrobcích, rybách či medu.

Funkcionalizací zlatého povrchu multivrstvou zakončenou specifickou protilátkou proti botulotoxinu (viz obrázek 3.4) byli schopni pomocí SPR senzoru detekovat koncentraci  $1 \text{ ng ml}^{-1}$ . Koncentrace botulotoxinu v kontaminovaných potravinách jsou vždy nad  $3 \text{ ng ml}^{-1}$ . To znamená, že senzory založené na tomto principu jsou schopny označit potraviny, ve kterých je botulotoxin přítomen [9].

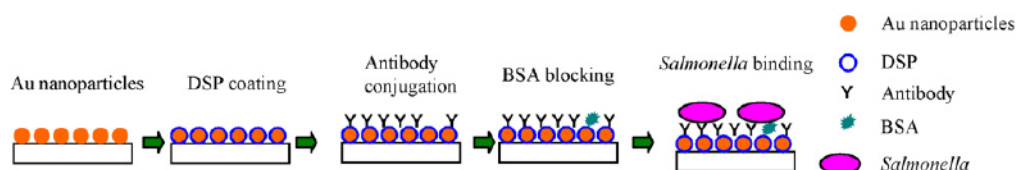


Obrázek 3.4: Detekce botulotoxinu pomocí SPR senzoru [9]. Nahoře je vidět schéma multikanálového SPR senzoru v tzv. Kretschmannově uspořádání se světelným paprskem (Light Beam) odrážejícím se totálním odrazem na rozhraní hranolu (Prism) zlaté vrstvy, kde jsou naznačeny 4 průtočné kanály (Flow Channels). Ve spodní části je naznačeno uspořádání multivrstvy na povrchu senzoru. Na zlatou vrstvu je navázaný oligo(etylenglykol) z jedné strany thiolovaný (S-konec) a z druhé strany zakončen buď alkoholovou skupinou (OH-terminated OEG Thiol) nebo biotinem (Biotin-terminated OEG thiol). Na tyto konce se přes streptavidinový komplex váže biotinylovaná protilátka (Biotinylated antibody). Tou se zachycuje zkoumaný neurotoxin (Botulinum Neurotoxin) a ještě se na něj naváže sekundární protilátka (Secondary Antibody), aby struktura byla těžší a tudíž snáz detekovatelná.

### 3.1.3 Detekce bakteriálních antigenů

Antigeny jsou molekuly nejčastěji povrchových struktur bakterií, virů a dalších patogenů. Právě pomocí těchto antigenů se dá buňka identifikovat, protože buněčná stěna bakterií má většinou na vnější straně zabudované specifické antigeny. Díky nim je

možné buňku zachytit na protilátkami funkcionalizované nanostruktury a změřit její přítomnost v okolí nanostruktur. Junxue Fu a jeho tým [10] uvádí, že díky funkcionalizovanému zlatému povrchu se jim podařilo zachytit a změřit přítomnost bakterií *Salmonella*. Jako podklad pro tento senzor použili sklo pokryté 3 nm chromu. Na tento podklad napařili 10 nm tlustou vrstvu zlata (vytvořila sférické struktury), kterou funkcionalizovali pomocí DSP – dithiobis(succinimidyl)propionát – a na něj navázali protilátky anti-*Salmonella*. Povrch dále upravili (nanesli z roztoku) pomocí hovězího sérového albuminu (BSA), aby nedocházelo k nespecifickému navázání čehokoliv jiného. Pozorovali posun rezonančního maxima plazmonového píku, který navíc odpovídal i jejich vypočteným teoretickým hodnotám.



Obrázek 3.5: Detekce bakterií *Salmonella* pomocí LSPR senzoru (z anglického Localised Surface Plasmon Resonance). Tento senzor využívá změny optických vlastností rezonance lokalizovaných povrchových plazmonových polaritonů, viz sekce 4.4). Na sklo byla napařena 3 nm silná vrstva chromu a následně 10 nm tlustá vrstva zlata. Zlato vytvářelo na povrchu sférické struktury. Tyto struktury byly funkcionalizovány pomocí DSP (DSP coating) a na něj byly navázány protilátky anti-*Salmonella* (Antibody conjugation). Povrch byl upraven pomocí BSA, který blokuje navázání jakékoliv nespecifické chemikálie (BSA blocking). Takto připravený senzor je schopen detekovat navázání bakterií *Salmonella* na jeho povrch (*Salmonella* binding) [10].

Výše uvedený článek ukazuje, že je možné vyrobit senzor, který by velice rychle odhalil přítomnost bakterií, což by byl velký přínos do detekce onemocnění pacientů. Nyní se dělají zdlouhavé testy spočívající v růstu kolonií bakterií z odebraného vzorku. V případě použití LSPR senzoru by stačilo aplikovat odebraný a např. ve fyziologickém roztoku rozpuštěný vzorek na tento senzor a na výsledek by se nemuselo čekat více než pár minut.

Další oblastí využití tohoto principu je bezpochyby hygiena a bezpečnost potravin. Bakterie se totiž hojně vyskytují v potravinách a to nejen zkažených. Možnost detekce v potravinách dokládá i tým vedený Allenem D. Taylorem (opět s českou účastí prof. Homoly) [11]. Zde byly studovány možnosti detekce čtyř různých bakterií v jednom roztoku na jednom multikanálovém SPR senzoru.

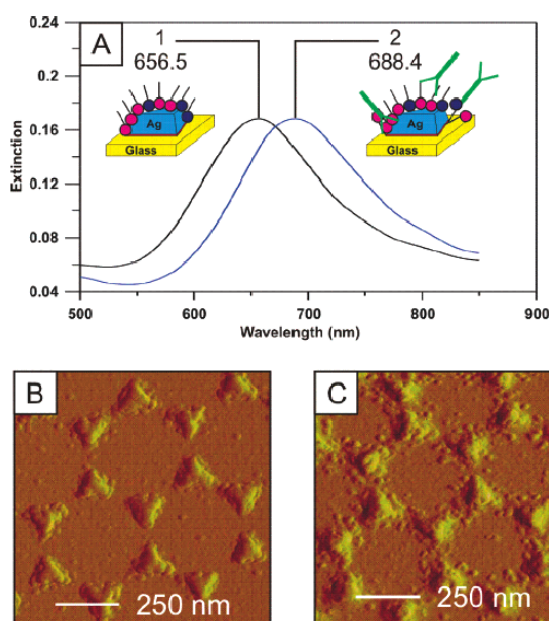
V každém kanálu byl zlatý povrch funkcionalizován multivrstvou zakončenou specifickými protilátkami proti antigenům zkoumaných bakterií (*C. jejuni*, *L. monocytogenes*, *E. coli* a *Salmonella* spp). Bakterie byly společně umístěny do tří různých roztoků – roztoku s pH 7,4, jablečného džusu s přírodním pH 3,7 a jablečného džusu nastaveného na pH 7,4. Ve všech třech případech byli schopni detekovat přítomnost bakterií od koncentrace  $3,4 \cdot 10^3$  CFU ml<sup>-1</sup> do  $1,2 \cdot 10^5$  CFU ml<sup>-1</sup> (Colony Forming Unit – kolonie tvořící jednotky, někdy se značí KTJ).

Obě publikace dokazují možnosti detekce bakterií v nízkých koncentracích. Bohužel ale posun rezonanční frekvence u takto detekovaných celých buněk je řádově v jednotkách nanometrů, protože buňky jsou poměrně velké a nevejdou se do detekční oblasti obsahující nanostruktury celé. Nabízí se tedy možnost rozbít buňky (např. bakterie) již před navázáním na nanostruktury a detekovat pouze části rozbitých buňečných stěn. Takto by se mohl povrch nanostruktur zaplnit daleko více a posun rezonančního maxima by zřejmě byl větší.

### 3.1.4 Detekce markerů chorob

Funkcionalizované nanostruktury by mohly být využity také k detekci markerů různých chorob. Většina chorob se u člověka projevuje přítomností určitých biomolekul – tzv. markerů. Pomocí funkcionalizovaných nanostruktur by se daly tyto choroby detekovat již v brzkém stádiu díky nízkým detekčním limitům, které použití funkcionalizovaných nanostruktur umožňuje dosáhnout.

Názorně to ukazuje práce výzkumného týmu vedeného Amandou J. Haes [12]. V tomto článku je popsána možnost detekce markeru Alzheimerovy nemoci (mozkového jedu ADDL – z anglického „amyloid beta-derived diffusible ligands“). K detekci použili protilátkou anti-ADDL funkcionalizované stříbrné nanostruktury ve tvaru trojúhelníku (viz obrázek 3.6).



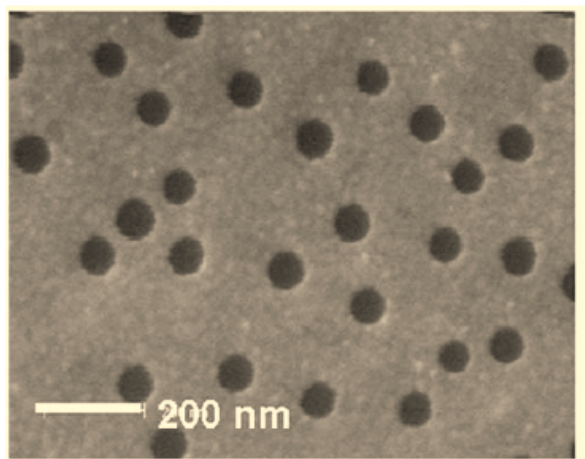
Obrázek 3.6: Posun rezonančního maxima při detekci pomocí LSPR senzoru (A), stříbrné nanostruktury před (B) a po funkcionalizaci (C) [12].

Bylo možno detekovat koncentrace až do cca  $10^{-8}\text{M}$ , při nižších koncentracích se již projevovalo nespecifické navázání jiných molekul na senzor.

Jednou z dalších chorob, které je nutno odhalit v co nejranějším stádiu je rakovina. To znamená detekovat rakovinné markery v co nejmenší koncentraci. Tímto se zabývali například na University of California [13]. Zde byl detekován antigen



CA 19-9, který se používá k detekci rakoviny jater. V tomto experimentu byl využit funkcionalizovaný zlatý povrch, ve kterém byly díry o průměru 60 nm (viz obrázek 3.7). Povrch byl pokryt multivrstvou zakončenou protilátkou proti zmíněnému antigenu. Aby nedocházelo k nespecifickému navázání molekul a znehodnocení celého testu, byla vytvořena multivrstva i uvnitř děr. Celý tento systém fungoval na principu LSPR senzoru.

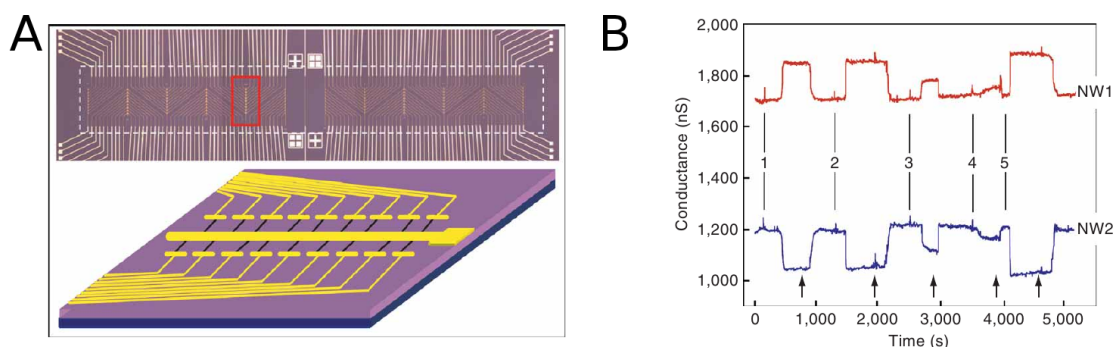


Obrázek 3.7: Zlatý povrch s 60nm dírami [13].

Takto upravený povrch senzoru byl vystaven nejprve dvěma látkám, které se na povrch vázat neměly (hovězí sérový albumin – BSA a karcinomní embryonický antigen – CEA) a poté se povrch vystavil roztoku antigenu CA 19-9 o koncentraci  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Výsledkem byla specifická detekce antigenu CA 19-9 v koncentraci  $2 \mu\text{g/ml}$ , což po přepočtu odpovídá zhruba 1 pg antigenu na měřené ploše.

Detekcí rakovinných markerů se také zabýval tým G. Zhenga [14]. V této práci je popsána specifická detekce PSA (prostatického specifického antigenu), jehož zvýšená produkce je charakteristickým znakem maligních prostatických tkání. Pomocí měření vodivosti funkcionalizovaných polovodičových nanodrátků bylo možno detekovat přítomnost PSA. Byl vyroben sensorový čip (viz obrázek 3.8A) s nanodráty z dopovaného křemíku. Díky lokální změně náboje (po navázání detekovaného antigenu) byla také měřitelná změna vodivosti jednotlivých nanodrátků – řádově desítky nS při koncentraci PSA v řádu jednotek  $\text{pg ml}^{-1}$  (viz obrázek 3.8B). Detekční limit byl stanoven na koncentraci  $75 \text{ fg ml}^{-1}$ , při nižších koncentracích už byl poměr signál/šum  $< 3$ . Takto bylo možno specificky detekovat PSA i z neředitelného séra, kde koncentrace ostatních proteinů byla zhruba o 9 řádů vyšší. V závěru článku je zdůrazněno, že detekční limit byl způsoben jen dostupným elektronickým vybavením.





Obrázek 3.8: (A) Čip vyrobený k detekci PSA. Znázorněný výřez má rozměry  $6 \times 0,5 \mu\text{m}^2$ . (B) Graf závislosti vodivosti (Conductance) polovodičových nanodrátků (NW1 – polovodič typu p, NW2 – polovodič typu n) na čase. Svislé čáry s čísly naznačují čas, kdy byly na čip mikrofluidním systémem přivedeny roztoky PSA v koncentraci: (1)  $9 \text{ pg ml}^{-1}$  (2)  $0,9 \text{ pg ml}^{-1}$  (3)  $0,9 \text{ pg ml}^{-1} + 10 \mu\text{g ml}^{-1}$  BSA (4)  $0 \text{ pg ml}^{-1} + 10 \mu\text{g ml}^{-1}$  BSA (5)  $9 \text{ g ml}^{-1}$  [14].

### 3.1.5 Detekce aptamerů, oligonukleotidů a DNA

Detekci DNA, aptamerů<sup>1</sup> a oligonukleotidů se v posledních několika letech dostalo velké pozornosti, protože mají velké uplatnění v medicíně, diagnostice a v monitorování v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Většina experimentů identifikuje specifické sekvence (sekvenování DNA) hybridizací sondy, která je imobilizována na nanostruktuře. Sekvenování DNA je důležité pro detekci patogenů a v biomedicinském výzkumu.

Jako nanostruktury se v tomto případě většinou používají zlaté nanočástice a sondy se imobilizují vazbou thiol-zlato. Tato funkcionalizace je jednoduchou chemickou reakcí, která nepotřebuje nákladné vybavení.

Momentálně nejvíce prací se zabývá využitím zlatých nanočástic ke snížení limitu detekce a zvýšení citlivosti senzorů.

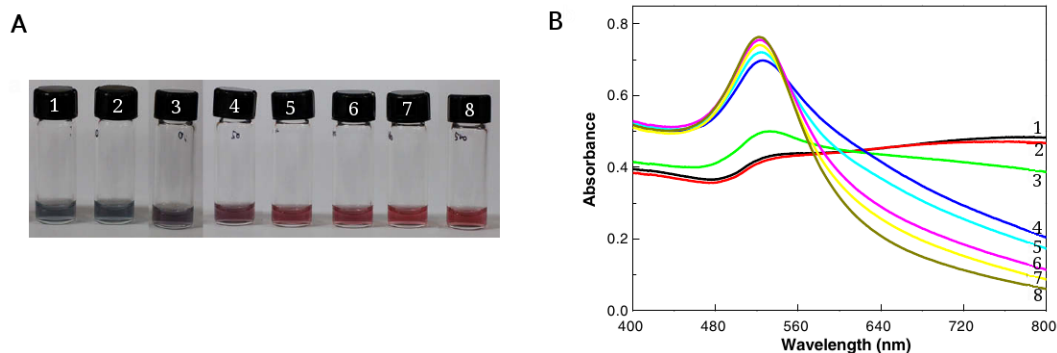
Například v článku [16] bylo zjištěno, že jednovláknová a dvouvláknová DNA se liší v adsorpci na zlaté nanočástice. Také zjistili, že jednovláknová DNA stabilizuje koloidní roztok zlatých nanočástic a brání jejich shlukování. Pomocí jednoduchého kolorimetrického měření byli schopni odlišit DNA jednovláknovou od dvouvláknové. Toho může být využito při detekci specifické sekvence DNA pomocí hybridizace. Dále byli schopni rozlišit i jednobázový mismatch (nedokonalé spárování) a to při femtomolové koncentraci DNA. Dále tato stejná vědecká skupina v článku [17] ukázala, že jednovláknová DNA se dobře váže na záporně nabitě zlaté nanočástice, ale dvouvláknová nikoliv. Po navázání fluorescenční molekuly na jednovláknovou

<sup>1</sup>**Aptamery** jsou jednořetězcové oligonukleotidy DNA nebo RNA, mohou existovat také aptamery peptidové. Všechny tyto molekuly nabývají nejrůznějších trojrozměrných struktur a díky tomu na sebe dokážou navázat téměř jakoukoli proteinovou nebo sacharidovou molekulu. Některé aptamery na sebe mohou vázat také viry, což otevírá cestu k novým způsobům terapie chřipkové infekce [15].

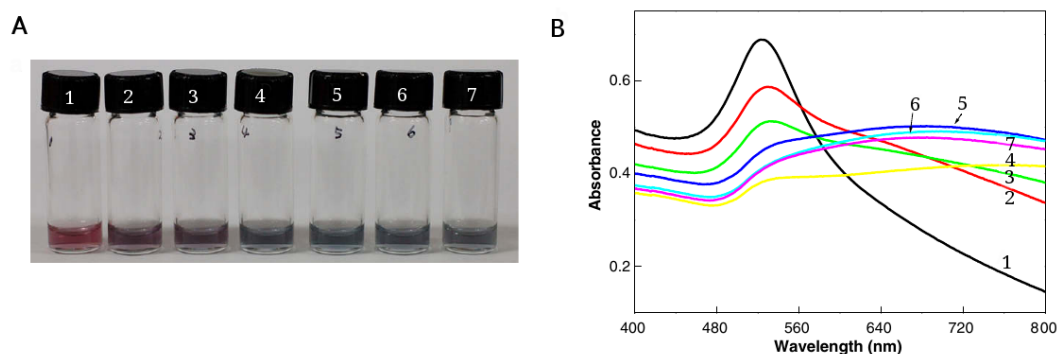
DNA bylo zjištěno, že po navázání na zlaté nanočástice dochází ke zhášení fluorescence. Takto lze opět jednoduše detekovat hybridizaci. Při hybridizaci dochází k elektrostatickému odpuzení molekuly z povrchu a obnovení fluorescence.

Jednovláknovou DNA funkcionalizovanými nanočásticemi se zabýval například vědecký tým z Jižní Koreje [18]. Byl zkoumán jednak vliv koncentrace jednovláknové DNA na koloidní roztok zlatých nanočástic s NaCl a pak také vliv koncentrace komplementárního řetězce na optické vlastnosti roztoku zlatých nanočástic funkcionalizovaných jednovláknovou DNA. Na obrázku 3.9A jde vidět změnu barvy způsobenou různou koncentrací jednovláknové DNA. To koresponduje s absorpčním spektrem, které je na obrázku 3.9B. Jednovláknová DNA (ssDNA) totiž stabilizuje koloidní roztok zlatých nanočástic a opět se objevuje typické absorpční maximum zlatých nanočástic okolo 520 nm, které bylo bez jednovláknové DNA eliminováno shlukováním nanočástic.

Druhou část experimentu popisuje obrázek 3.10. V této části vědecký tým zkoumal závislost přítomnosti komplementárního řetězce na optické vlastnosti roztoku zlatých nanočástic, které byly funkcionalizovány jednovláknovou DNA. Na obrázku lze vidět vliv hybridizace na opětovnou nestabilitu koloidního roztoku, a tudíž vymizení absorpčního maxima okolo 520 nm. Čím větší je koncentrace komplementárního řetězce, tím větší je koncentrace hybridizovaných molekul DNA. Ty jsou záporně nabitým povrchem zlatých nanočástic elektrostaticky odpuzovány a způsobují větší úbytek jednovláknové DNA (spotřebované při hybridizaci), která stabilizuje koloidní roztok. Poměr  $R_{ss/c}$  vyjadřuje poměr koncentrací jednovláknové DNA (ss), kterou byly funkcionalizované zlaté nanočástice a jejího komplementárního řetězce (c).



Obrázek 3.9: (A) Změna barvy 8,5nM koloidního roztoku zlatých nanočástic s 50 µl 1M NaCl v přítomnosti různé koncentrace 20b ssDNA. (B) Absorpční spektrum roztoků. Koncentrace ssDNA byla (1) 0 M, (2) 0,01 µM, (3) 0,08 µM, (4) 0,1 µM, (5) 0,3 µM, (6) 0,4 µM, (7) 0,6 µM, (8) 1,0 µM [18].



Obrázek 3.10: (A) Změna barvy 8,5nM roztoku jednovláknovou DNA funkcionalizovaných zlatých nanočástic v přítomnosti různé koncentrace komplementárního řetězce. (B) Absorpční spektrum roztoků. Poměr koncentrací  $R_{ss/c}$  byla (1) 0, (2) 0,5, (3) 0,75, (4) 0,80, (5) 0,85, (6) 0,90, (7) 1,00 [18].

## 3.2 Funkcionalizace za účelem stabilizace koloidních roztoků

Koloidní roztoky nanočástic mají tendenci se shlukovat a sedimentovat. Ve většině případů má agregace za následek ztrátu vlastností spojovaných s koloidním stavem těchto nanočástic. Ke stabilizaci koloidních roztoků se používá několika mechanismů.

### Elektrostatická stabilizace

Iontové sloučeniny, jako jsou halogenidy, karboxyláty nebo polyoxoanionty rozpuštěné v roztoku (většinou vodném), mohou způsobovat elektrostatickou stabilizaci. Adsorpce těchto sloučenin a jejich odpovídající protionty na povrchu kovu vytvoří okolo částic elektrickou dvojvrstvu, což vyvolá odpudivou elektrostatickou interakci mezi částicemi. Pokud je elektrický potenciál dvojvrstvy dostatečně velký, potom elektrostatická repulze zabráňuje agregaci částic. Elektrostaticky stabilizované koloidní suspenze jsou velmi citlivé na jakékoliv vlivy, které ruší dvojvrstvu, jako je třeba iontová síla nebo teplota, takže kontrola těchto parametrů je nezbytná pro zajištění účinné stabilizace koloidu.

Účinnost elektrostatické stabilizace lze jednoduše zjistit změnou iontové síly roztoku, čehož lze například docílit přidáváním soli. Při vytvoření takové iontové síly roztoku, která rozruší elektrostatickou repulzi, dojde k agregaci nanočástic, která je doprovázena změnou vlnové délky plazmonové rezonance a často lze pozorovat pouhým okem (viz obrázek 3.1). Tento test je všeobecně rozšířen a kromě jiného slouží i k potvrzení změny elektrostatické stabilizace po modifikaci nanočástic.

### Stérická stabilizace

Druhý způsob, jak mohou být koloidní kovové částice ochráněny před agregací, je použití makromolekul, jako jsou dendrimery, polymery, blokové kopolymery nebo oligomery, které kolem nanočástic vytvoří ochrannou vrstvu. Aby byla stabilizace

účinná, musí být povrch zcela pokryt dostatečně silnou vrstvou pevně vázané stabilizující látky.

Při přibližování dvou částic, na jejichž povrchu je hustá vrstva pevně adsorbovaných makromolekul, mohou adsorbované vrstvy buď navzájem pronikat, nebo dojde k jejich stlačování. Na to, který z případů nastane, má vliv kvalita disperzního prostředí, tj. afinita k rozpouštědлу. Stabilizační účinek se projevuje pouze za podmínek, kdy je disperzní prostředí pro polymer dobrým rozpouštědlem (obrázek 3.11). V tomto rozpouštědle nedochází k vzájemnému pronikání (proplétání) molekul, protože vyvíjejí odpor proti stlačování. To brání dalšímu přiblížení částic a tím i agregaci.

Při velmi vysokých molárních hmotnostech se může dlouhá makromolekula současně adsorbovat na povrchu několika částic a tím je k sobě přitahovat. Při nízkých koncentracích polymeru to může vést k tzv. můstkové flokulaci.

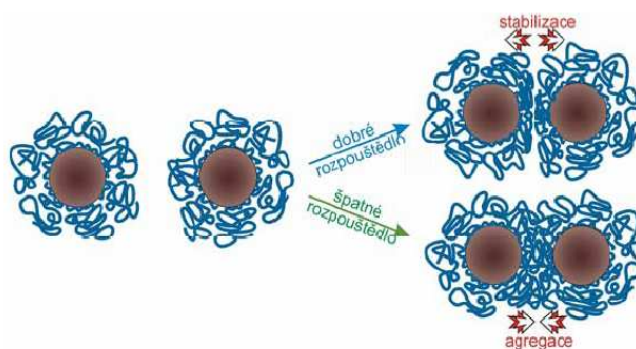
V porovnání s elektrostatickou stabilizací, která je většinou používána ve vodném prostředí, může být sterická stabilizace použita jak v organické, tak ve vodné fázi.

### Elektrosterická stabilizace

Elektrostatická a sterická stabilizace mohou být využity zároveň z důvodu udržení kovových nanočástic v roztoku. Jako stabilizátory se používají již zmíněné iontové detergenty nebo organokovy. Tyto sloučeniny nesou jak polární funkční skupinu, umožňující generovat elektrickou dvojvrstvu, tak lipofilní řetězec poskytující sterickou repulzi.

### Stabilizace ligandem nebo rozpouštědlem

Termín stabilizace ligandem byl vybrán proto, aby popsal použití tradičních ligandů ke stabilizaci koloidů přechodných kovů. Tato stabilizace je umožněna interakcí kovové nanočástice s ligandy jako jsou například fosfiny, thioly, jejich deriváty a aminy [19, 20].



Obrázek 3.11: Vliv rozpouštědla na sterickou stabilizaci [20].

### 3.3 Funkcionalizace za účelem cíleného navádění nanočástic

Nanočástice samotné kvůli své velikosti nemohou proniknout přes buněčnou membránu. Funkcionalizací lze dosáhnout toho, že membránové přenašeče s molekulami, které normálně přenášejí, přenesou i nanočástice funkcionizované těmito molekulami.

Takto se nemusí doručovat pouze samotné nanočástice do buňky, ale mohou s sebou nést další molekuly, které se uvolní například v buňce změnou pH. V přehledové práci [21] jsou naznačeny možnosti využití funkcionizovaných zlatých nanočástic jako nosičů jednoduchých molekul, jako jsou například silně reaktivní singletový kyslík  $^1\text{O}_2$  nebo oxid dusnatý NO.

Nanočástice jsou schopné do buněk doručit i větší biomolekuly. Vědecké týmy už uspěly ve snaze doručit do buňky i peptidy, proteiny a nukleové kyseliny, včetně DNA i RNA. Tohoto se například dá využít v genové terapii, i když je efektivita menší než u doručení DNA pomocí virů.

Cíleného navádění částic se dá využít při tzv. fototerapii. Nanočástice jsou funkcionizovány antigeny, které jsou specificky vychytávány protilátkami vystavenými na povrchu buněčných membrán. Takto se například na zlaté nanočástice naváže antigen, který je specifický k protilátkám na povrchu rakovinných buněk. Díky interakci antigen-protilátka se zlatá nanočástice přichytí na povrch buňky. Když jsou zlaté nanočástice ozářeny světlem o vlnových délkách v rozmezí 800 nm - 1400 nm, způsobují lokální zahřívání okolní tkáně. Takto se dají zničit například nádorové tkáně.

Dále se na povrchu nanočástic funkcionizovaných specifickými antigeny dají do cílové oblasti doručovat i léky (účinné látky). Velkou výhodou tohoto specifického doručování účinných látek je především omezení vedlejších účinků léků [21].

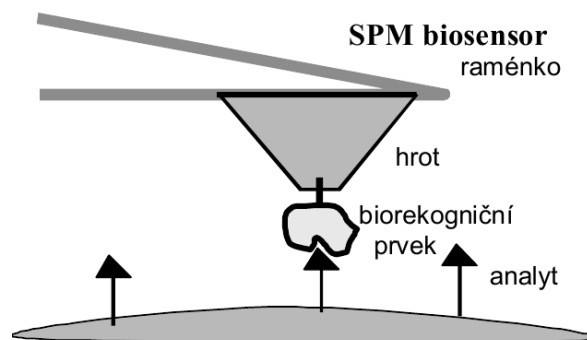
Celkově se dá říct, že v této oblasti mají funkcionizované nanočástice velký potenciál. Ovšem zatím se neobjevily žádné studie prokazující jejich zdravotní nezávadnost.

### 3.4 Funkcionalizace za účelem studia molekulových interakcí

V molekulární biologii a chemii je studium molekul a jejich vzájemných interakcí velmi důležité k pochopení mechanismů například chemických reakcí nebo prostorových uspořádání (bio)molekul. K simulacím těchto interakcí jsou vytvářeny komplexní počítačové programy, které jsou pomocí kvantových výpočtů schopny přibližně stanovit, jak je která vazba nebo interakce silná.

Studium interakcí se díky možnosti funkcionizovat hrot SPM (rastrovací sondová mikroskopie z anglického Scanning Probe Microscopy) může provádět i experimentálně v laboratoři.

Základem je funkcionizace hrotu SPM jedním typem molekuly a imobilizace molekul druhého typu na povrch vzorku. Následně je raménko SPM od povrchu oddalováno a snímá se síla, která na něj působí (obrázek 3.12)



Obrázek 3.12: Znázornění experimentálního uspořádání [22].

Druhým typem uspořádání je imobilizace molekuly na povrch vzorku. Volný konec molekuly je ošetřen tak, aby se navázal na hrot SPM. Opět se raménko SPM oddaluje od povrchu a zkoumá se síla, která na něj působí. V tomto případě lze však sledovat velikost interakce funkčních skupin, které jsou zodpovědné za prostorové uspořádání molekuly. Celý tento proces je tedy založen na „rozplétání“ molekul.

Takto byly experimentálně určeny síly interakcí například mezi streptavidinem a biotinem ( $260 \pm 120$  pN) [22] nebo byly zjištěny síly, které drží pohromadě řetězce dvouvláknové DNA [23]. V této práci byla molekula DNA uchycena oběma 5'-konci. Jedním k povrchu a druhým k hrotu AFM. Takto zjištěná síla na odtrhnutí řetězců od sebe byla 20 pN – 50 pN.

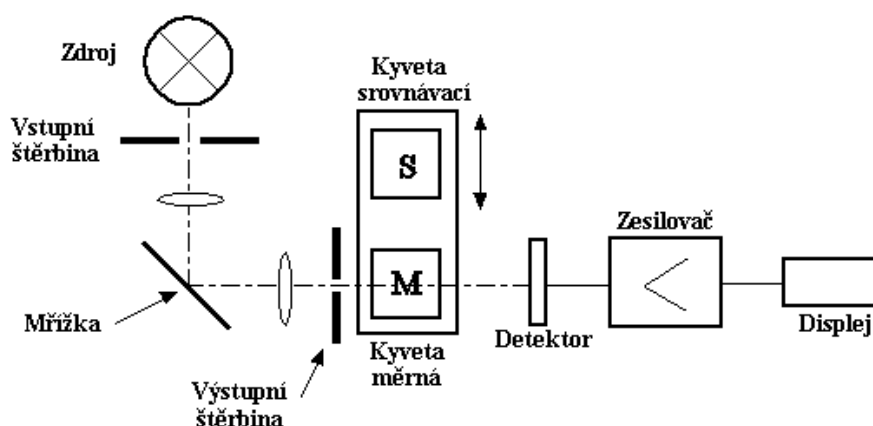
## 4 METODY DETEKCE

V této kapitole budou shrnuty metody detekce změny vlastností nanostruktur po jejich funkcionalizaci. Jedná se většinou o změnu optických vlastností. K tomu slouží jak jednodušší metody, mezi které patří například kolorimetrie, a pak také komplexní metody, k nimž patří například elipsometrie. Kromě těchto uvedených metod se používají metody využívající SPR (povrchovou plazmonovou rezonanci z anglického Surface Plasmon Resonance) a LSPR (lokalizovanou povrchovou plazmonovou rezonanci z anglického Localised Surface Plasmon Resonance). Další metodou, která se dá využít, je FTIR spektroskopie (z anglického Fourier Transform InfraRed spectroscopy)

### 4.1 Kolorimetrie

Kolorimetrické metody se nejčastěji využívají ve spojení s roztoky. Například spektrofotometrie měří spektrální absorbanci či transmitanci roztoků. V biochemii se tato metoda používá ke stanovení koncentrace určité látky v roztoku porovnáváním absorbance při určité vlnové délce, která odpovídá spektrálnímu maximu absorpce.

Tato metoda se dá využít i pro detekci funkcionalizace nanočástic v koloidních roztocích. Funkcionalizací se většinou mění vlnová délka absorpčního maxima a to lze pak porovnáním spekter velice snadno rozlišit. Příklad experimentálního uspořádání zachycuje obrázek 4.1



Obrázek 4.1: Uspořádání spektrofotometrické sestavy [24]. Světlo pocházející od zdroje je vstupní štěrbinou omezeno v úzký svazek. Difrakcí na mřížce se ze svazku vybere jedna vlnová délka, jejíž maximum se nachází v optické ose soustavy. Svazek se znovu omezí štěrbinou, projde kyvetou se vzorkem, je zachycen detektorem a poté převeden na digitální výstup na displeji.

### 4.2 Elipsometrie

Elipsometrie je metoda optické analýzy vlastností povrchů a tenkých vrstev, která je založena na sledování změn polarizace světla po jeho odrazu od rozhraní. Při něm

se mění amplituda i fáze složky  $E_s$  ( $s$  - složka vektoru intenzity elektrického pole kmitající kolmo k rovině dopadu) obecně jinak než u složky  $E_p$  ( $p$  - složka vektoru intenzity elektrického pole kmitající v rovině dopadu) a lineárně polarizované světlo se v důsledku toho po odrazu obecně mění na elipticky polarizované (odtud také pochází název elipsometrie). Schéma uspořádání lze vidět na obrázku 4.2. Při měření je pak možné získat informaci o povrchových vrstvách, jejichž tloušťky jsou menší než vlnová délka použitého světla. Elipsometrie na rozdíl od většiny optických metod není limitována difrakcí a může dosáhnout vertikálního rozlišení v řádu desetin nanometru.

Výstupem z elipsometrického měření jsou vždy dva parametry  $\Psi$  a  $\Delta$ , resp. jejich závislost na úhlu dopadu, úhlu analyzátoru a vlnové délce. Z nich je potom možné vypočítat například tloušťku vrstvy, na které došlo k odrazu, její dielektrickou funkci či jiné optické konstanty. Pokud jsou tato měření prováděna pouze pro jednu vybranou vlnovou délku, jde o tzv. jednovlnnou elipsometrii. Ta našla uplatnění zejména v technické praxi. Spektroskopická elipsometrie – tedy měření spektrální závislosti  $\Psi$  a  $\Delta$  – zůstává doménou spíše vědeckých laboratoří a bude používána i v této práci.

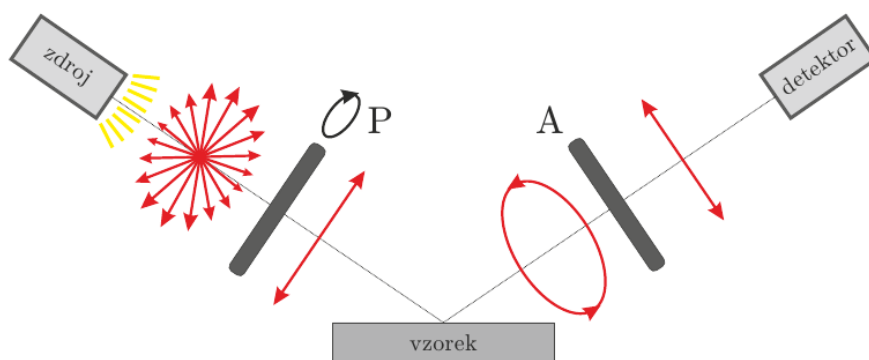
Dalším krokem je pak hledání teoretického modelu, jemuž odpovídající závislosti parametrů  $\Psi$  a  $\Delta$  nejlépe vystihují ty experimentálně určené. Tomuto procesu se říká fitování. Spočívá v kombinaci znalostí fyzikálních vlastností daného vzorku (např. tloušťka vrstev) a numerických metod hledání ostatních parametrů teoretického modelu (např. dielektrická funkce materiálu) takovým způsobem, aby se minimalizovala odchylka modelu příslušejících parametrů od těch naměřených. V případě vzorků se zlatými nanočásticemi na křemíkovém povrchu, které budou měřeny v této práci, je však takový proces velice obtížný a vyžaduje hluboké znalosti této problematiky. Samotná elipsometrická spektra nejsou pro účely této práce případě příliš názorná, a proto je z nich vypočtena tzv. pseudodielektrická funkce  $\tilde{\epsilon}$ . Složitý model, který by vystihoval všechny aspekty (multivrstvého) povrchu pokrytého kovovými nanočásticemi, je v tomto případě nahrazen modelem jedné polonekonečné vrstvy s komplexní dielektrickou funkcí  $\tilde{\epsilon}$ . Z ní pak lze určit komplexní index lomu či jiné optické konstanty příslušející takové vrstvě.

Výhodou této metody je jednoduché provedení a absence chromatických vad, nevýhodou je větší chyba měření v případech, kdy se parametr  $\Delta$  blíží k  $0^\circ$ , resp.  $180^\circ$  a složitější interpretace výsledků [25].

## 4.3 SPR

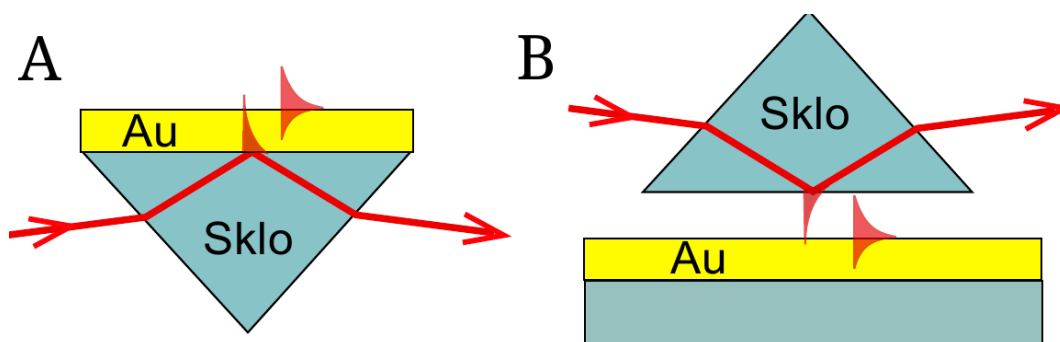
S příchodem nanotechnologií a s přípravou tenkých vrstev nastal rozvoj i v metodách detekce. Po popsání jevu povrchových plazmonů a polaritonů se jich začalo využívat pro zlepšení detektorů a k snížení detekčních limitů senzorů. SPR senzory se sestávají ze zdroje světla, transparentního hranolu a transdukčního povrchu (vrstva vzácného kovu). Transdukční povrch je obvykle tvořen 50 - 100 nm tlustou zlatou vrstvou na sklíčku (čip SPR biosenzoru), které je imerzním olejem opticky spojeno s hranolem. Kromě zlata se používají ještě další kovy např. stříbro, měď nebo hliník, ale zlato je preferováno pro svou chemickou stabilitu. Umístěním zlatého filmu se odlišují dvě konstrukce, Ottova a Kretschmannova (obrázek 4.3). V Ottově konfiguraci není zlatý





Obrázek 4.2: Schématické zobrazení elipsometrické sestavy. Ze zdroje vychází nepolarizované světlo, prochází polarizátorem (P) a mění se na lineárně polarizované. Po odrazu je světlo elipticky polarizované, analyzátozem (A) se opět polarizuje lineárně a je snímáno detektorem. Převzato z [25].

film v přímém kontaktu s hranolem, ale v dosahu evanescentních vln. Plazmony se vybudí a šíří se po kovovém povrchu v prostoru mezi hranolem a kovovou vrstvou. Pro praktické použití se tato konfigurace příliš nehodí, a používá se Kretschmannova konfigurace. Původně byl film kovu nanesen přímo na hranol, avšak výměnná sklíčka se zlatou vrstvou umožňují provedení různých analýz, přičemž hranol zůstává stejný [26].



Obrázek 4.3: Schématické znázornění Kretschmannova (A) a Ottova uspořádání (B).

## 4.4 LSPR

LSPR senzory využívají stejného principu jako SPR senzory s jediným rozdílem, že využívají plazmonické struktury na povrchu kovové vrstvy. Plazmonickými strukturami mohou být například anténky nejrůznějších tvarů. Poloha jejich absorpčního (rezonančního) maxima ve spektru záleží především na jejich tvaru, ale také na vzdálenosti mezi nimi [27].

## 4.5 FTIR

V této metodě infračervené záření dopadá na povrch vzorku, část z něj je absorbována a část se odrazí. Odražené záření je pak zachycováno detektorem. Výsledné spektrum pozorované detektorem je ochuzeno o záření, které je pohlceno molekulami nebo strukturami, které mají absorpční maximum v IR oblasti. Tato metoda bude taktéž použita v této práci.

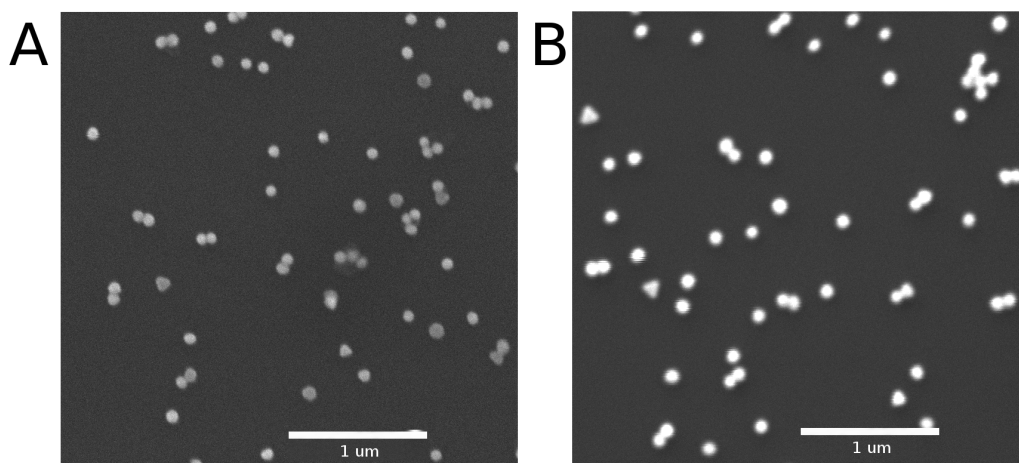
## 5 PRAKTICKÁ ČÁST

### 5.1 Příprava nanostruktur pro funkcionalizaci

Jako nanostruktury vhodné k funkcionalizaci jsem si zvolil dvě různá uspořádání zlata na křemíkovém podkladu.

Prvním uspořádáním byly 80 nm velké zlaté nanočástice (0D) nadeponované na křemíkovou destičku. Křemíkové destičky o velikosti cca  $15 \times 15 \text{ mm}^2$  byly odřezány z desek fosforem či borem dopovaného monokrystalického křemíku o krystalové orientaci (100) a tloušťce cca  $525 \mu\text{m}$ . Na křemíkovém povrchu byl ponechán nativní oxid a proběhlo pouze očištění proudem dusíku ( $\text{N}_2$ ). Samotná depozice probíhala z 1 ml komerčně dostupného koloidního roztoku 80nm zlatých kuliček upraveného 3,29  $\mu\text{mol}$  HCl. Pro větší podrobnosti a vysvětlení procedury v [25].

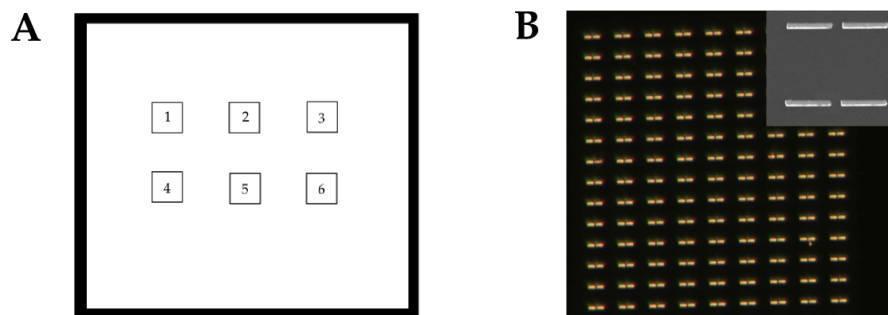
Takto připravené vzorky byly použity pro elipsometrická měření. Snímek nadeponovaných kuliček pořízený elektronovým mikroskopem jsou zobrazeny na obrázku 5.1.



Obrázek 5.1: Snímek kuliček pořízený elektronovým mikroskopem před (A) a po (B) funkcionalizaci.

Druhým uspořádáním byla pole zlatých antének (2D). Antény byly vytvořeny ve spolupráci s Jiřím Babockým pomocí EBL (elektronové litografie, z anglického Electron Beam Lithography) [28]. Na křemík bylo litografií připraveno 6 polí antén o třech různých délkách ramének. Byla snaha antény vytvořit o šířce 200 nm s mezerou mezi raménky o šířce 400 nm a o délkách ramének 1,2  $\mu\text{m}$ , 1,5  $\mu\text{m}$  a 1,8  $\mu\text{m}$ . Rozestupy mezi jednotlivými anténkami byly 3  $\mu\text{m}$ .

Takto připravené vzorky byly vytvořeny pro měření pomocí FTIR spektroskopie. Schématický náčrt polí je vidět na obrázku 5.2A. Snímek z optické mikroskopie v temném poli na obrázku 5.2B a snímek z elektronového mikroskopu ve výřezu obrázku 5.2B.



Obrázek 5.2: (A) - Schématické zobrazení vzorku připraveného pro FTIR měření. 1 - 6 jsou pole připravených antén. Pole velikosti  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  jsou umístěna ve větším rámečku, který byl připraven, aby bylo možné oblast s anténami vidět pouhým okem. Pole 1 a 5 odpovídá poli antén s délkou raménka  $1,2 \mu\text{m}$ , pole 2 a 6 odpovídá poli antén s délkou raménka  $1,5 \mu\text{m}$  a pole 3 a 4 odpovídá poli antén s délkou raménka  $1,8 \mu\text{m}$ . (B) - Snímek pole antén z optické mikroskopie v temném poli. Ve výřezu snímek antén z elektronového mikroskopu s šířkou raménka  $1,8 \mu\text{m}$ .

## 5.2 Roztoky pro funkcionalizaci

Z Ústavu chemie a biochemie Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně byly poskytnuty 4 roztoky thiolované jednovláknové DNA. Roztoky se lišily délkou řetězce - dva roztoky byly s délkou řetězce 15 bází (dále pouze 15b) a dva roztoky s délkou řetězce 10b. Od každé délky řetězce byly poskytnuty dvě různé koncentrace a to  $25 \text{ mgml}^{-1}$  a  $100 \text{ mgml}^{-1}$ . Pro přehlednost jsem je shrnul do tabulky 5.1.

Tabulka 5.1: Tabulka shrnující délky řetězců a koncentrací v jednotlivých vzorcích.

	délka řetězce	koncentrace / $\text{mgml}^{-1}$
Roztok 1	15 bází	25
Roztok 2	15 bází	100
Roztok 3	10 bází	25
Roztok 4	10 bází	100

## 5.3 Elipsometrické měření

Pro elipsometrické měření byly využity předem připravené 80nm zlaté kuličky na čtyřech křemíkových destičkách (viz kapitola 5.1) a byly měřeny pomocí elipsometru v laboratoři Masarykovy univerzity. Úhel dopadu světla byl po změření několika úhlů nastaven na  $70^\circ$ , kdy měření vykazovalo nejmenší šum. Při tomto nastavení byly změřeny tyto čtyři vzorky jako reference. Poté byly na tyto vzorky napipetovány uvedené roztoky, každý na jiný vzorek. Roztoky byly ponechány v kontaktu s roztoky po dobu pěti minut, protože po předchozí zkušenosti delší kontakt s roztokem neměl na výsledky vliv. Následně byly omyty destilovanou vodou a funkcionalizované vzorky

byly ještě osušeny, aby nebylo měření ovlivněno přítomností kapaliny. A opět bylo provedeno elipsometrické měření.

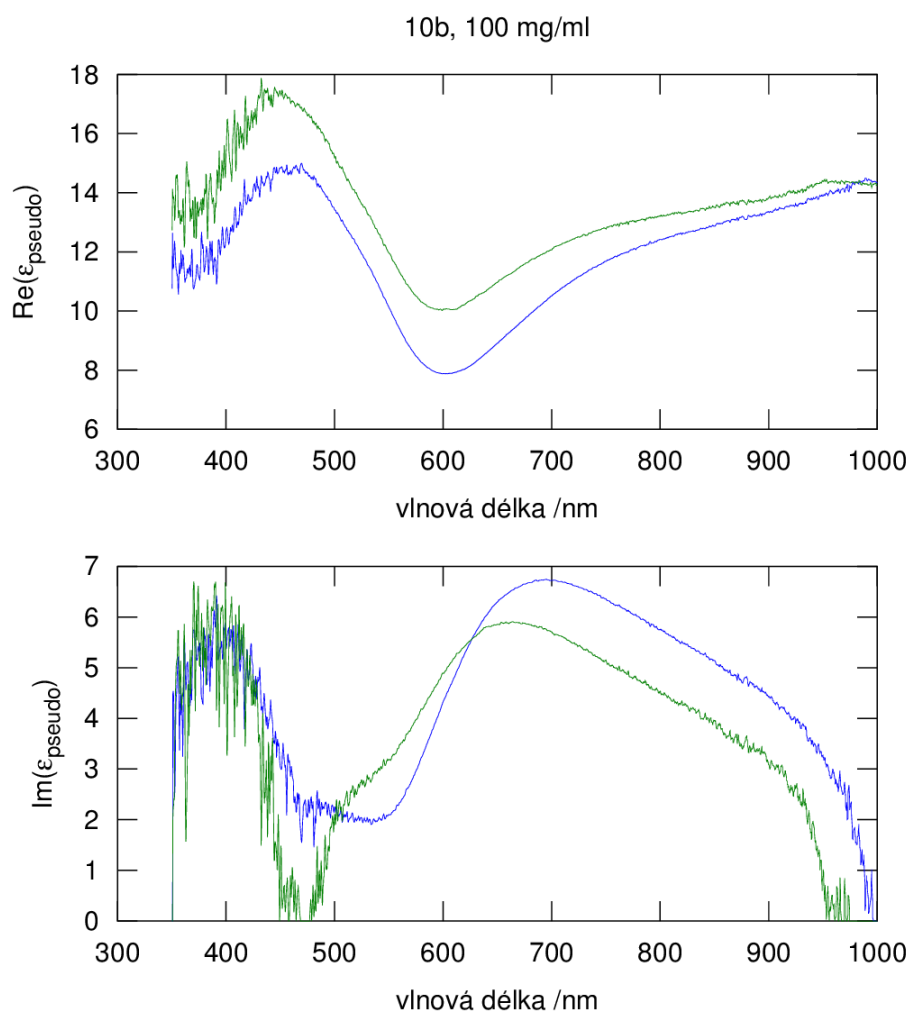
Z takto naměřených dat byly vypočteny pseudodielektrické funkce příslušných vzorků (jak referenčních, tak funkcionalizovaných) a ty byly mezi sebou porovnávány. Funkcionalizace měla ovlivnit pseudodielektrickou funkci referenčních vzorků [29]. Bylo proto očekáváno, že se pseudodielektrické funkce vzorku před a po funkcionalizaci budou lišit posunutím maxim (minim), tak i jejich deformací.

Na obrázku 5.3 je zobrazen výsledek měření pro roztok 4. Experimenty s ostatními roztoky vykazují podobné změny. Z obrázku jde vidět, že se v reálné části pseudodielektrické funkce minimum v oblasti kolem 600 nm neposouvá, ale celá křivka je posunuta do vyšších hodnot pseudodielektrické funkce, což odpovídá zvýšenému indexu lomu v celém spektru. V imaginární části pseudodielektrické funkce jsou výsledky zajímavější. Celé spektrum se zdá být posunuté ve směru k nižším vlnovým délkám. Také celá křivka se posouvá k nižším hodnotám ve vertikálním směru. Výsledky měření jsem shrnul do tabulky 5.2. Hodnoty byly odečteny s grafů s odchylkou  $\pm 4$  nm.

Z tabulky 5.2 je zřejmé, že po funkcionalizaci se minimum v reálné části pseudodielektrické funkce výrazně neposouvá ani nedeformuje.

Výrazný posuv křivky v řádu desítek nm je však dobře vidět v komplexní části pseudodielektrické funkce. Z tabulky 5.2 lze vyčíst, že delší řetězec vykazuje větší posuv než kratší a koncentrace roztoků na posuv vliv nemá. Rozdíl délky řetězce o 5 bází v tomto případě znamenal změnu posuvu o cca 10 nm. Pro detailnější prostudování vlivu délky řetězce na změnu posuvu by bylo potřeba více roztoků s různou délkou řetězce. Nejzajímavější ale na celém měření je posun křivky na opačnou stranu, než se předpokládalo. Posuv totiž nastal do kratších vlnových délek, tudíž do větších energií. Většinou se v literatuře hovoří o tzv. červeném posuvu, což znamená posuv absorpčních křivek po funkcionalizaci do vyšších vlnových délek. Bohužel se zatím nepodařilo najít literaturu, která by se podobnou skutečností zabývala a i přes spolupráci s Lukášem Brínkem jsme nedokázali tento opačný posuv plně vysvětlit. Nabízí se zde možnost, že molekula jednovláknové DNA stáčí rovinu polarizovaného světla díky chirálním uhlíkům ve své molekule. Tato skutečnost by ovlivňovala celé elipsometrické měření a mohla by celou křivku posunout. Další vlivy, například agregaci nanocástic, jsem vyloučil porovnáním snímků z elektronového mikroskopu (viz obrázek 5.1), ze kterých je zřejmé, že funkcionalizace nezpůsobí přeuspořádání nanocástic. Taktéž soustavnou chybu v měření či v přepočítávání lze s největší pravděpodobností vyloučit, protože se na elipsometru před experimentem měřil známý vzorek a po přepočtech vykazoval očekávané hodnoty pseudodielektrické funkce.

Dalším postupem v této problematice by mohlo být ověření vlivu délky řetězce na posuv křivky proměřením více vzorků a ověření stáčivosti roviny polarizovaného světla molekulami DNA. Dále by měla být dokončena aparatura na měření absorpance a transmitance koloidních roztoků funkcionalizovaných nanocástic a postupné začlenění průtočných cel do celého systému, což by mělo umožnit v reálném čase sledovat změny optických vlastností vlivem funkcionalizace.



Obrázek 5.3: Změřená reálná (nahore) a komplexní (dole) část pseudodielektrické funkce. Modrá barva odpovídá referenčnímu vzorku a zelená barva odpovídá vzorku po funkcionalizaci v tomto případě roztokem s jednovláknovou DNA o délce 10b s koncentrací  $100 \text{ mgml}^{-1}$ .

Tabulka 5.2: Tabulka shrnující pozice extrémů v naměřených datech.

	Pozice minima v $\text{Re}(\tilde{\epsilon})$ /nm		Pozice maxima v $\text{Im}(\tilde{\epsilon})$ /nm		
	Reference	Po aplikaci	Reference	Po aplikaci	Rozdíl maxim
Roztok 1	602	604	703	660	43
Roztok 2	602	594	703	657	46
Roztok 3	603	596	700	665	35
Roztok 4	602	599	696	662	34

## 5.4 FTIR

Pro toto měření byly připraveny vzorky s poli antén (viz výše) a celý experiment probíhal na FTIR spektroskopu ve spolupráci s POLYMER INSTITUTE BRNO, s.r.o.

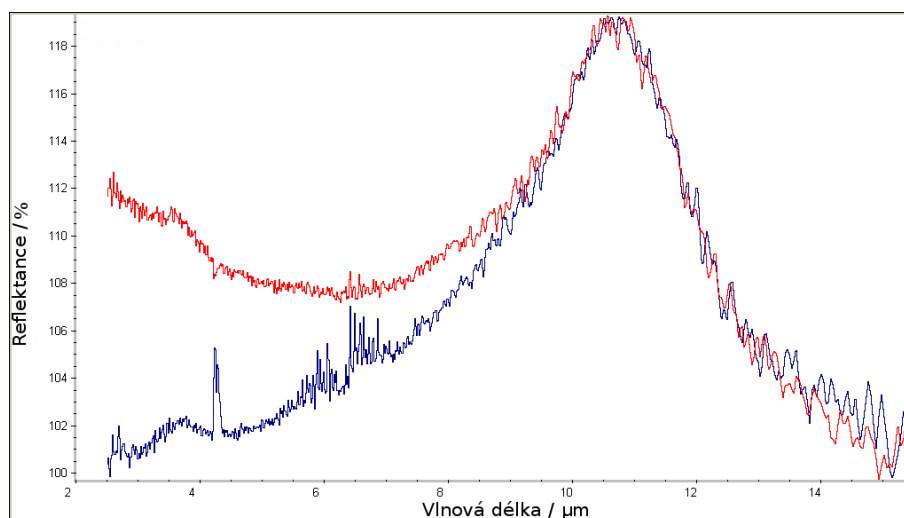
Na začátku experimentu jsme se potýkali s technickými problémy, protože připravené nanostruktury nebyly v optickém mikroskopu, připojeném k měřicímu přístroji, vidět. Tuto záležitost jsme vyřešili napodobením mikroskopie v temném poli, kdy bylo vypnuto přímé osvětlení a z boku byl ruční svítilnou osvětlován vzorek. Rozptýlené světlo od nanostruktur bylo dostatečné k zaměření jednotlivých polí. Po nastavení parametrů měření v počítači byla nejprve změřena referenční spektra polí antén, poté byl na 5 minut aplikován roztok 4, vzorek byl opláchnut, usušen, opět a vložen do aparatury. Opět byla změřena spektra všech šesti polí.

Od experimentu bylo očekáváno, že se v referenčním spektru objeví absorpční maxima ( $\lambda_m$ ) odpovídající rozměrům antének:

$$\lambda_m = 2l n_{ef}, \quad (1)$$

kde  $n_{ef}$  je efektivní index lomu (pro zlaté nanostruktury na křemíku je  $n_{ef} = 3, 4$ ). Dále se předpokládalo, že v naměřeném spektru po funkcionalizaci se toto absorpční maximum posune nebo bude deformovat a také, že se ve spektru objeví absorpční maxima odpovídající absorpci jednotlivých bází DNA.

Obrázek 5.4 ukazuje změřené spektrum pole číslo 4. Ostatní naměřená spektra vykazují stejné tvary obou křivek. Změřené polohy maxim ve spektru a změřené rozměry antén z obrázků pořízených elektronovým mikroskopem jsem shrnul do tabulky 5.3.



Obrázek 5.4: Spektrum pole číslo 4 změřené FTIR spektroskopií. Modrá barva odpovídá referenčnímu spektru a červená barva odpovídá spektru změřenému po funkcionalizaci.

Tabulka 5.3: Tabulka naměřených hodnot, kde  $l_n$  je navrhovaná délka raménka,  $l_{FTIR}$  je délka raménka vypočtená ze zjištěné  $\lambda_m$ ,  $l_{SEM}$  je délka raménka změřená ze snímků z elektronového mikroskopu a  $n_{ef}(vyp)$  je hodnota efektivního indexu lomu vypočtená z  $\lambda_m$  a  $l_{SEM}$ .

pole	$l_n / \mu\text{m}$	Max / $\text{cm}^{-1}$	$\lambda_m / \mu\text{m}$	$l_{FTIR} / \mu\text{m}$	$l_{SEM} / \mu\text{m}$	$n_{ef}(vyp)$
1	1,20	1540	6,494	0,95	1,28	2,54
2	1,50	1110	9,009	1,32	1,57	2,87
3	1,80	930	10,753	1,58	1,85	2,91
4	1,80	935	10,695	1,57	1,89	2,83
5	1,20	1510	6,623	0,97	1,23	2,69
6	1,50	1140	8,772	1,29	1,55	2,83

Na grafu na obrázku 5.4 lze vidět výrazné maximum v okolí  $10,7 \mu\text{m}$ , což by mělo odpovídat poli antének o délce raménka  $1,57 \mu\text{m}$ . Dále lze pozorovat šum mezi vlnovými délkami  $5,5 - 7 \mu\text{m}$  způsobený molekulami  $\text{H}_2\text{O}$  a dále lokální maximum ve vlnové délce okolo  $4,25 \mu\text{m}$  způsobené molekulami  $\text{CO}_2$ . Naklonění celé křivky je způsobeno jiným zaostřením objektivu. Očekávaný posuv nebo deformace maxima nebyl pozorován, ale taktéž nebyly zaznamenány maxima odpovídající jednotlivým bázím DNA. Ty by se naneštěstí měly objevit v oblasti šumu způsobené molekulami  $\text{H}_2\text{O}$ . Absence deformace či posuvu maxima by mohlo znamenat, že už byl roztok starý a molekuly jednovláknové DNA se na povrch zlatých nanostruktur ne navázaly nebo vliv DNA na zlaté nanostruktury není pozorovatelný. První možnost je pravděpodobnější z důvodu absence maxim od jednotlivých bází, které by měly být i přes šum od molekul vody být vidět.

Dále jsem srovnal délky ramének antén. Navrhované antény měly raménka o délkách  $1,2 \mu\text{m}$ ,  $1,5 \mu\text{m}$  a  $1,8 \mu\text{m}$ . Odpovídající délky změřené z obrázků z elektronového mikroskopu jsou v průměru  $1,25 \mu\text{m}$ ,  $1,56 \mu\text{m}$  a  $1,87 \mu\text{m}$ . Z FTIR spektroskopie pomocí přepočtu z polohy maxima z rovnice (1) vyšly hodnoty v průměru  $0,96 \mu\text{m}$ ,  $1,31 \mu\text{m}$  a  $1,58 \mu\text{m}$ . Z výsledků plyne, že efektivní index lomu  $n_{ef} = 3,4$  neodpovídá naměřené hodnotě z hodnot  $l_{SEM}$  a  $\lambda_m$  (viz  $n_{ef}(vyp)$  v tabulce 5.3). To může být způsobeno přítomností například nativního oxidu, který má v daných vlnových délkách efektivní index lomu  $1,25$  (při vlnové délce  $6,5 \mu\text{m}$ ),  $0,5$  (při  $9 \mu\text{m}$ ) a  $2,1$  (při  $10,7 \mu\text{m}$ ) [30]. V tomto případě by efektivnímu indexu lomu odpovídala spíše hodnota  $n_{ef} = 2,7 \pm 0,16$ .

Dalším postupem by v tomto případě bylo proměření více vzorků a ověření přítomnost jednovláknové DNA na již proměřeném vzorku a také větší integrační čas jednotlivých spekter, který by mohl výrazně snížit šum a lépe by se dala pozorovat případná deformace či posunutí maxim.



## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnovala funkcionalizovaným nanostrukturám z hlediska možného využití v oborech biochemie, medicíny a biomedicíny. V první části byla provedena rešeršní studie z vědeckých článků zabývajících se touto problematikou a nastínění aktuálních směrů výzkumu, možnosti využití a metody detekce funkcionalizovaných nanostruktur.

V praktické části byly popsány provedené experimenty. V prvním experimentu byl zjištěn vliv funkcionalizace zlatých nanostruktur na křemíkovém substrátu, která byla provedena jednovláknovou DNA. Bylo zjištěno, že funkcionalizace má zásadní vliv na imaginární část pseudodielektrické funkce. Funkcionalizace 10 bází dlouhou DNA posunula spektrum v průměru o 34,5 nm a 15 bází dlouhý řetězec jednovláknové DNA posunul křivku v průměru o 44,5 nm. Obě křivky jsou od referencí posunuty do nižších vlnových délek - modrý posuv. Prozatím jsou tyto výsledky přisuzovány vlastnosti jednovláknové DNA stáčet rovinu polarizovaného světla, a tudíž ovlivněním celého principu elipsometrického měření. Po této práci by mělo následovat ověření vlivu délky řetězce na posunutí závislosti imaginární části pseudodielektrické funkce na vlnové délce záření proměřením více vzorků a využití jiných metod k detekci změn optických vlastností nanostruktur, například kolorimetrické metody po sestrojení aparatury na měření absorpčních spekter.

Ve druhém experimentu byl měřen vliv jednovláknové DNA na optické vlastnosti připravených zlatých antén na křemíkovém substrátu s nativním oxidem. Vliv DNA změřen nebyl, nejspíše v důvodu neproběhnutí funkcionalizace struktur díky stárí roztoků. Bylo ale zjištěno, že nativní oxid křemíku výrazně ovlivňuje efektivní index lomu křemíku v infračervené oblasti spektra a byl stanoven na hodnotu  $n_{ef} = 2,7 \pm 0,16$ , přičemž čistý křemík má v této oblasti  $n_{ef} = 3,4$ . Dalším postupem v této problematice by mělo být proměření více vzorků a ve spolupráci s Ing. Lukášem Břínkem celou situaci simulovat.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] YOURDSHAHYAN, Y. – ZHANG, H. K. – RAPPE, A. M. *n*-alkyl thiol head-group interactions with the Au(111) surface. *Phys. Rev. B*. 2001, 63, s. 081405. doi: 10.1103/PhysRevB.63.081405. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.63.081405>.
- [2] LU, A.-H. – SALABAS, E. – SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, 46, 8, s. 1222–1244. doi: 10.1002/anie.200602866. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200602866>.
- [3] BUNKER, B. C. a kol. Ceramic Thin-Film Formation on Functionalized Interfaces Through Biomimetic Processing. *Science*. 1994, 264, s. 48–55. doi: 10.1126/science.264.5155.48. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/content/264/5155/48>.
- [4] KŮSOVÁ, K. a kol. Brightly Luminescent Organically Capped Silicon Nanocrystals Fabricated at Room Temperature and Atmospheric Pressure. *ACS Nano*. 2010, 4, 8, s. 4495–4504. doi: 10.1021/nn1005182. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn1005182>.
- [5] STAVIS, C. a kol. Surface functionalization of thin-film diamond for highly stable and selective biological interfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, 108, 3, s. 983–988. doi: 10.1073/pnas.1006660107. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1006660107>.
- [6] CHANANA, M. – CORREA-DUARTE, M. A. – LIZ-MARZÁN, L. M. Insulin-Coated Gold Nanoparticles: A Plasmonic Device for Studying Metal–Protein Interactions. *Small*. 2011, 7, 18, s. 2650–2660. doi: 10.1002/smll.201100735. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201100735>.
- [7] OJEA-JIMÉNEZ, I. a kol. Citrate-Coated Gold Nanoparticles As Smart Scavengers for Mercury(II) Removal from Polluted Waters. *ACS Nano*. 2012, 6, 3, s. 2253–2260. doi: 10.1021/nn204313a. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn204313a>.
- [8] FELTIS, B. a kol. A hand-held surface plasmon resonance biosensor for the detection of ricin and other biological agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, 23, 7, s. 1131 – 1136. doi: 10.1016/j.bios.2007.11.005. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566307004691>.
- [9] LADD, J. a kol. Detection of botulinum neurotoxins in buffer and honey using a surface plasmon resonance (SPR) sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008, 130, 1, s. 129 – 134. doi: 10.1016/j.snb.2007.07.140. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092540050700593X>.
- [10] FU, J. – PARK, B. – ZHAO, Y. Limitation of a localized surface plasmon resonance sensor for Salmonella detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*.

- 2009, 141, 1, s. 276 – 283. doi: 10.1016/j.snb.2009.06.020. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509004997>.
- [11] TAYLOR, A. D. a kol. Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, 22, 5, s. 752 – 758. doi: 10.1016/j.bios.2006.03.012. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656630600090X>.
- [12] HAES, A. J. a kol. A Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor: First Steps toward an Assay for Alzheimer's Disease. *Nano Letters*. 2004, 4, 6, s. 1029–1034. doi: 10.1021/nl049670j. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl049670j>.
- [13] GAO, D. a kol. Detection of tumor markers based on extinction spectra of visible light passing through gold nanoholes. *Applied Physics Letters*. 2007, 90, 7, s. 073901. doi: 10.1063/1.2535919. Dostupné z: [http://apl.aip.org/resource/1/applab/v90/i7/p073901\\_s1](http://apl.aip.org/resource/1/applab/v90/i7/p073901_s1).
- [14] ZHENG, G. a kol. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nature Biotechnology*. 2005, 23, 10, s. 1294–1301. doi: 10.1038/nbt1138. Dostupné z: [http://www.nature.com/nbt/journal/v23/n10/supinfo/nbt1138\\_S1.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v23/n10/supinfo/nbt1138_S1.html).
- [15] *Aptamerové léky proti chřipce zatím na vzdáleném obzoru* [online]. [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: [http://www.chripka.cz/odbornici/aptamerove-leky-proti-chripce-zatim-na-vzdalenem-obzoru-340?&confirm\\_rules=1](http://www.chripka.cz/odbornici/aptamerove-leky-proti-chripce-zatim-na-vzdalenem-obzoru-340?&confirm_rules=1).
- [16] Li, H. – Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2004, 101, s. 14036–14039. doi: 10.1073/pnas.0406115101. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?artid=521116>.
- [17] LI, H. – ROTHBERG, L. J. DNA Sequence Detection Using Selective Fluorescence Quenching of Tagged Oligonucleotide Probes by Gold Nanoparticles. *Analytical Chemistry*. 2004, 76, 18, s. 5414–5417. doi: 10.1021/ac049173n. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac049173n>.
- [18] RHO, S. a kol. Colorimetric detection of ssDNA in a solution. *Current Applied Physics*. 2009, 9, 2, s. 534 – 537. doi: 10.1016/j.cap.2008.03.025. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567173908000849>.
- [19] ŘEZANKA, P. *Nanočástice – Nanočástice I* [online]. [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://ksicht.natur.cuni.cz/serialy/nanocastice/1>.

- [20] ŠENK, V. *Keramické materiály s pěnovou strukturou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2009. 38 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Jaroslav Cihlář, CSc.
- [21] GHOSH, P. a kol. Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, 60, 11, s. 1307 – 1315. doi: 10.1016/j.addr.2008.03.016. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X08000999>.
- [22] SKLÁDAL, P. *Biosensory*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2002. 149 s.
- [23] STRUNZ, T. a kol. Dynamic Force Spectroscopy of Single DNA Molecules. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1999, 96, s. 11277–11282. doi: 10.1073/pnas.96.20.11277. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?artid=18024>.
- [24] ŘEZANKA, P. 1. díl: *Spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra* [online]. [cit. 2012-05-07]. Dostupné z: [http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id\\_serie=1](http://ksicht.iglu.cz/serial.php?id_serie=1).
- [25] LIGMAJER, F. *Depozice kovových nanočástic z roztoku a výzkum jejich optických vlastností*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2011. 27 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Miroslav Kolíbal, Ph.D.
- [26] STEJSKAL, V. – HAJŠLOVÁ, J. – KOCOUREK, V. *Bioanalytické metody pro hodnocení bezpečnosti zemědělských surovin a produktů* [online]. 2008. [cit. 2012-05-09]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/project.php?idp=92>.
- [27] CHUNG, T. a kol. Plasmonic Nanostructures for Nano-Scale Bio-Sensing. *Sensors*. 2011, 11, s. 10907 – 10929. doi: doi:10.3390/s111110907. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/11/11/10907/pdf>.
- [28] BABOCKÝ, J. *Tvorba plazmonických mikro a nanostruktur pomocí elektronové litografie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kvapil.
- [29] LOSURDO, M. a kol. Size dependence of the dielectric function of silicon-supported plasmonic gold nanoparticles. *Phys. Rev. B*. 2010, 82, s. 155451. doi: 10.1103/PhysRevB.82.155451. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevB.82.155451>.
- [30] PALIK, E. D. *Handbook of Optical Constants of Solids*. San Diego: Academic Press, c1998, 5 v. ISBN 0-12-544420-6.